

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10257887 A**

(43) Date of publication of application: **29.09.98**

(51) Int. Cl.

C12N 15/09
B32B 5/18
B32B 5/32
C12M 1/00
C12M 1/12
C12M 1/14
C12N 1/21
C12Q 1/68
/(C12N 1/21 , C12R 1:19)

(21) Application number: **08340867**

(22) Date of filing: **20.12.96**

(30) Priority: **30.09.96 JP 08258357**

(71) Applicant: **DAINIPPON PRINTING CO LTD**

(72) Inventor:
KUHARA SATORU
TASHIRO KOSUKE
MUTA SHIGERU
NAKAGAWA YOSHIKAZU
OKA MOTOHIRO

(54) **GENE ANALYZER AND ANALYSIS**

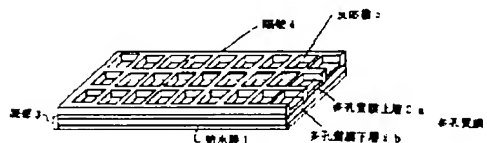
hybridization in the same reactional site.

(57) Abstract:

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide the subject apparatus capable of analyzing many genes at a time by installing a plural number of reactional vessels formed of a bottom formed of laminated plural number of porous membranes and partition walls formed in the upper part of the porous membranes.

SOLUTION: This gene analyzer is obtained by using a waterproof membrane 1 as the lowermost layer, installing a bottom 3 formed of a porous membrane 2 comprising at least two or more layers of a porous membrane upper layer 2a and a porous membrane lower layer 2b different in material, using a material capable of functioning as a filter membrane and permeating genes and proteins without permeating cells as the membrane upper layer 2a and a material capable of functioning as a nucleic acid immobilizing membrane and immobilizing the genes on the layer without permeating the genes as the porous membrane lower layer 2b and then installing an assembly of a plural number of reactional vessels 5 formed of partition walls 4 in the upper part of the porous membrane 2. The resultant analyzer is capable of analyzing the many genes at a time by performing amplification and purification of the genes, immobilizing operations thereof onto the porous membrane and



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-257887

(43) 公開日 平成10年(1998) 9月29日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

A

B 3 2 B 5/18

B 3 2 B 5/18

5/32

5/32

C 1 2 M 1/00

C 1 2 M 1/00

A

1/12

1/12

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-340867

(71) 出願人 000002897

(22) 出願日 平成8年(1996)12月20日

大日本印刷株式会社

東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号

(31) 優先権主張番号 特願平8-258357

(72) 発明者 久原 哲

福岡県福岡市南区檜原7-31-17

(32) 優先日 平8(1996)9月30日

(72) 発明者 田代 康介

福岡県福岡市東区名島4-40-27

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(72) 発明者 牟田 滋

福岡県福岡市東区原田2-16-4 世利荘
8号

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子解析装置および方法

(57) 【要約】 (修正有)

【解決手段】 防水膜及びそれに積層された多孔質膜により形成される底部と、多孔質膜の上部に設けられた隔壁とにより形成される複数の反応槽よりなる遺伝子解析装置。該装置の反応槽内に、遺伝子を有するベクターを保持した宿主細胞を接種し、多孔質膜に固定した遺伝子と相補性のある遺伝子との間でハイブリダイゼーションを行い、ハイブリッド形成を検出することを含む遺伝子解析方法、培養上記装置の反応槽内に、遺伝子を有するベクターを保持した宿主細胞を接種し、該細胞を培養して遺伝子の増幅・精製を行った後、多孔質膜に遺伝子を固定する遺伝子固定膜の製造方法。

【効果】 遺伝子の増幅・精製、多孔質膜への固定操作、ハイブリダイゼーションを同一反応場中で行うことにより、一度に多数の遺伝子の解析を行うことができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 積層された複数の多孔質膜により形成される底部と、多孔質膜の上部に設けられた隔壁とにより形成される複数の反応槽からなる遺伝子解析装置。

【請求項2】 多孔質膜の上層が細胞を透過せず、遺伝子および蛋白質を透過することのできる請求項1記載の遺伝子解析装置。

【請求項3】 多孔質膜の下層が遺伝子を透過せず、かつ層上に遺伝子を固定することのできる請求項1記載の遺伝子解析装置。

【請求項4】 底部を構成する多孔質膜が隔壁より脱着可能な請求項1記載の装置。

【請求項5】 最下層に防水膜を有する請求項1記載の装置。

【請求項6】 積層された複数の多孔質膜により形成される底部と、多孔質膜の上部に設けられた隔壁とにより形成される複数の反応槽よりなる遺伝子解析装置の反応槽内に、遺伝子を有するベクターを保持した宿主細胞を接種し、該細胞を培養して遺伝子の増幅・精製を行った後、多孔質膜に遺伝子を固定し、該固定した遺伝子と相補性のある遺伝子との間でハイブリダイゼーションを行い、ハイブリッド形成を検出することを含む遺伝子解析方法。

【請求項7】 多孔質膜に遺伝子を固定したのち、PCR増幅を行う請求項6記載の遺伝子解析方法。

【請求項8】 それぞれのベクターに挿入された遺伝子の両末端に既知の共通配列を配置した請求項6記載の遺伝子解析方法。

【請求項9】 宿主細胞を大腸菌とし、ベクターをM13ファージとする請求項6記載の遺伝子解析方法。

【請求項10】 反応槽内での細胞培養後、各反応槽に対応するよう位置決めされた棒状の突起が集合した植菌用治具に各反応槽中の細胞を付着させ、新たな多孔質膜を設置した他の装置に移植することにより、遺伝子固定膜を複製する請求項6記載の遺伝子解析方法。

【請求項11】 積層された複数の多孔質膜により形成される底部と、多孔質膜の上部に設けられた隔壁とにより形成される複数の反応槽よりなる遺伝子解析装置の反応槽内に、遺伝子を有するベクターを保持した宿主細胞を接種し、該細胞を培養して遺伝子の増幅・精製を行った後、多孔質膜に遺伝子を固定化することを特徴とする遺伝子固定膜の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、一度に多数の遺伝子の構造・機能を解析できる遺伝子解析装置および方法に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、遺伝子工学の顕著な進展のもと、ヒトをはじめ多くの生物のゲノムの塩基配列が明らかと

なりつつあり、現時点で酵母ゲノムの全塩基配列の解読が完了し、ヒトゲノムも近い将来全塩基配列が解読されることが期待されている。しかしながら塩基配列を解読したのみでは生命情報を解読したとはいえず、解読された塩基配列の情報をもとに個々の遺伝子の解析を行うことが生命科学分野において非常に重要な課題となっている。

【0003】また、臨床検査の分野では現在でもクラミジア等の微生物、HIV、HCV等のウイルス感染の有無を検出する際にDNA検査が行われており、将来的にはゲノム中の遺伝子を調べることによって、遺伝病・ガン等の遺伝子由来の病気についてそれらが発病する前に予測診断を行うことが現行の体液検査に変わり増加すると予測されている。

【0004】遺伝子解析においては、解析しようとする未知の遺伝子、または機能・配列が既知の遺伝子をアガロースゲル上で電気泳動させ、ニトロセルロースやナイロン膜等の多孔質膜に塩濃度勾配により転写固定させるか（サザンブロッティング・ノーザンブロッティング）、または遺伝子を含む溶液を直接滴下して膜上に固定させ（ドットブロッティング）、その後放射性物質で標識した既知の遺伝子、または未知の遺伝子を供与し、膜に固定された遺伝子と標識遺伝子との間でハイブリダイゼーションを行い、ハイブリッド形成をオートラジオグラフィー等で検出することが行われている。しかしながら、現在使用されているブロッティング方法で遺伝子を固定し、ハイブリダイゼーションを行った場合、処理できる試料数は多くても96穴マイクロタイタープレート

をベースとした96サンプルであり、ゲノム解析のように一度に5000～50000程度の試料数を処理することができないという問題を有している。

【0005】また、通常遺伝子は市販の試薬の形態で供給される場合もあるが、多くの場合、大腸菌等をベースとした宿主ベクター系で供給され、またPCRにより増幅・精製された後に解析に供される。通常これらの操作はマイクロチューブ、マイクロタイタープレートにより行われ、多数の試料を処理することができないという問題を有している。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、遺伝子の増幅・精製、多孔質膜への固定操作、ハイブリダイゼーションを同一反応場中で行うことにより、一度に多数の試料を処理できる遺伝子解析装置および方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、積層された複数の多孔質膜により形成される底部と、多孔質膜の上部に設けられた隔壁とにより形成される複数の反応槽からなる遺伝子解析装置中で遺伝子を含む細胞を培養し、遺伝子

を増幅・精製した後、遺伝子を多孔質膜に固定し、該固定した遺伝子と相補性のある遺伝子との間でハイブリダイゼーションを行い、ハイブリッド形成を検出することにより、一度に多数の遺伝子の構造・機能を解析できることを見だし、本発明を完成するに至った。

【0008】即ち、本発明は、積層された複数の多孔質膜により形成される底部と、多孔質膜の上部に設けられた隔壁とにより形成される複数の反応槽よりなる遺伝子解析装置である。

【0009】本発明はまた、積層された複数の多孔質膜により形成される底部と、多孔質膜の上部に設けられた隔壁とにより形成される複数の反応槽よりなる遺伝子解析装置の反応槽内に、遺伝子を有するベクターを保持した宿主細胞を接種し、該細胞を培養して遺伝子の増幅・精製を行った後、多孔質膜に遺伝子を固定し、該固定した遺伝子と相補性のある遺伝子との間でハイブリダイゼーションを行い、ハイブリッド形成を検出することを含む遺伝子解析方法である。

【0010】本発明はさらに、反応槽内での細胞培養後、各反応槽に対応するよう位置決めされた棒状の突起が集合した植菌用治具に各反応槽中の細胞を付着させ、新たな多孔質膜を設置した他の装置に移植することにより、遺伝子固定膜を複製する上記遺伝子解析方法である。

【0011】本発明はさらにまた、積層された複数の多孔質膜により形成される底部と、多孔質膜の上部に設けられた隔壁とにより形成される複数の反応槽よりなる遺伝子解析装置の反応槽内に、遺伝子を有するベクターを保持した宿主細胞を接種し、該細胞を培養して遺伝子の増幅・精製を行った後、多孔質膜に遺伝子を固定化することを特徴とする遺伝子固定膜の製造方法である。以下、本発明を更に詳しく説明する。

【0012】

【発明の実施の形態】

〔1〕遺伝子解析装置

図1は、本発明の遺伝子解析装置を示すものであり、防水膜1およびそれに積層された2層の多孔質膜（多孔質膜上層2a、多孔質膜下層2b）により形成される底部3と、多孔質膜の上部に設けられた隔壁4とにより形成される複数の反応槽5の集合体である。

【0013】本発明の遺伝子解析装置の底部3は、防水膜1を最下層とし、その上に孔径・材質の異なる少なくとも2層以上の多孔質膜2が積層して形成される。多孔質膜は通常、多孔質膜上層2a、多孔質膜下層2bより成る。多孔質膜の材質として、多孔質膜上層2aはフィルター膜として機能し、細胞を透過せず、遺伝子および蛋白質を透過することができ、また多孔質膜下層2bは核酸固定膜として機能し、遺伝子を透過せず、かつ層上に遺伝子を固定することのできるものであれば特に限定されない。多孔質膜上層2aの反応槽同士の境界部分

は、隣合う反応槽中のDNAが多孔質膜を介して混入しないために多孔質体の孔をフィラー等で充填して閉塞する、あるいは熱融着または溶剤により多孔質体を部分的に融解せしめ、孔を消滅させるのが望ましい。防水膜1の材質としては、溶液を透過しなければ特に限定されない。防水膜1は操作環境が湿潤で底部からの乾燥が防止できる場合、あるいは多孔質膜下層2bのDNA固定容量が充分であり、底部から吸着されなかったDNAがリークしないような場合は必要としない。

10 【0014】多孔質膜の材質としては、具体的には、上層はガラスフィルター、セルロース濾紙、セルロースアセテート濾紙、ポリカーボネートメンブレン、セルロースアセテートメンブレン等が、下層はニトロセルロースメンブレン、ナイロンメンブレン、DEAEセルロース濾紙、DEAEセルロースメンブレン、PVDFメンブレン等が例示される。防水膜の材質としては、具体的には、ポリエチレン、ポリプロピレン等のポリオレフィンフィルム、PETフィルム、ポリ塩化ビニルフィルム等の高分子フィルム等が例示される。

20 【0015】本発明の遺伝子解析装置において、反応槽5は所望の形状で所望の数だけ形成される。予めシート状に反応槽の集合体を形成しておき、解析に供する試料数だけ切り取って使用してもよい。

【0016】反応槽5のサイズは、 $0.001 \times 0.001\text{mm}$ ～ $10 \times 10\text{mm}$ （縦×横方向）、深さ $0.001 \sim 10\text{mm}$ 程度とすることが例示され、好ましくは $2 \times 2\text{mm}$ （縦×横方向）、深さ $0.1 \sim 10\text{mm}$ とすればよい。反応槽5の容積は 1pl から形成可能であるが、 $0.001\text{ml} \sim 0.2\text{ml}$ が好ましい。

30 【0017】隔壁4は各反応槽5を仕切り、隣り合う反応槽中の成分が相互に混ざらないように多孔質膜2の上部に設けられる。隔壁の材質としてはDNA、タンパク質を吸着せず、反応系を阻害しないようなものであれば特に限定されないが、例えばポリオレフィン、ポリエチレン等の高分子材料、金属材料、シリコン等の無機材料が挙げられる。

40 【0018】隔壁の形成方法としては、あらかじめ隔壁のみを形成し、熱融着、接着、粘着、または成型品による凹凸嵌合のいずれかの手段で多孔質膜上に設置する方法、あるいは多孔質膜にある程度の膜圧のあるパターン塗布を行うことにより形成する方法がある。パターン塗布は、スクリーン印刷、ロールコーティング、電着、無電解めっき等により行うことができる。

【0019】底部を構成する多孔質膜は各層のうちのひとつまたは全てが独立して隔壁より脱着するようにできる。このためには例えば多孔質膜各層のうちのひとつまたは全てに、隔壁の部位に沿って粘着剤をパターン塗布したり、凹凸嵌合を設置する。

【0020】〔2〕遺伝子解析方法

50 本発明の遺伝子解析方法は、上記装置の反応槽内に遺伝子を有するベクターを保持した微生物等の宿主細胞を接

種し、該細胞を培養して遺伝子の増幅・精製を行った後、多孔質膜に遺伝子を固定し、固定した遺伝子と相補性のある遺伝子との間でハイブリダイゼーションを行い、ハイブリッド形成の有無を標識物質等にて検出する。標識物質としては、放射性物質、蛍光物質、インターカレートする蛍光試薬等を挙げることができる。

【0021】本発明の遺伝子解析方法において、多孔質膜に固定する遺伝子は、解析の対象となる配列・機能の全部または一部が未知の遺伝子（未知遺伝子）であっても、また配列・機能既知の遺伝子（既知遺伝子）であってもよい。また固定した遺伝子と相補性のある遺伝子とは、固定した遺伝子にハイブリダイズできるものであって、固定する遺伝子が未知遺伝子の場合は既知遺伝子を、また固定する遺伝子が既知遺伝子の場合は未知遺伝子を用いる。固定した遺伝子と相補性ある遺伝子との間のハイブリッド形成は、両遺伝子のいずれかに付された標識を検出することにより行う。

【0022】宿主細胞の反応槽への供与は多連ディスペンサロボットあるいは植菌治具等で供給される。宿主細胞・ベクター系は遺伝子の種類と解析目的に応じて使い分けられるが、特に精製処理の点で一本鎖のベクターを菌体外に放出する、大腸菌・M13ファージが望ましい。

【0023】ここで、宿主細胞を反応槽中で培養することにより、遺伝子を増幅・精製することができる。また、当該遺伝子を多孔質膜下層に固定するには、真空吸引、電圧付加、遠心分離等により行う。これにより、多孔質膜上層に菌体を残したまま多孔質膜下層に目的遺伝子を挿入したM13ファージが固定され、遺伝子固定膜が作成される。この膜は必要に応じて洗浄処理、ブロッキング、熱処理が可能である。

【0024】このようにして作成した遺伝子固定膜は、ハイブリダイゼーション解析あるいは後述する遺伝子増幅用で使用される。また、作成した遺伝子固定膜をオリジナルプレートとして、複製することもできる。まず、反応槽内での細胞培養後、各反応槽に対応するよう位置決めされた棒状の突起が集合した植菌治具に各反応槽中の細胞を付着させ、新たな多孔質膜（複製しようとするプレート）を設置した他の装置に移植する（図2）。

【0025】その後、同様にして該細胞を培養して遺伝子の増幅・精製を行った後、多孔質膜に遺伝子を固定すればよい。さらに、作製した遺伝子固定膜を取り出し、隔壁を再設置したものをプライマー、dNTP、Taqポリメラーゼを含む溶液を入れた反応槽に入れ、PCR反応により増幅することができる（図3）。PCRに用いるプライマーは、ベクターに挿入する遺伝子の両末端に予め既知配列（PCR用共通配列）を導入しておき、該配列に基づいて設計すればよい。

【0026】宿主細胞の培養、遺伝子の増殖・精製等の各行程における反応液の供給は、一般には上部より行うが、最下層（防水膜）を除いた後に底部の多孔質膜を介

しても可能である。また、吸水性素材を反応槽や多孔質膜に充填することによって反応液供給の効率を上げることも可能である。

【0027】

【実施例】

【実施例1】図4は、本発明の遺伝子解析装置の一実施例を示すものであり、防水膜1を最下層とし、その上に孔径・材質の異なる2層の多孔質膜（2a、2b）が積層して形成される底部3と、多孔質膜の上部に設けられた隔壁4とにより形成される複数の反応槽5よりなる。

【0028】各反応槽に、培養液（大腸菌培養用培地）6、大腸菌菌体7（大腸菌K12株）、各種の遺伝子を組み込んだM13ファージ8（M13mp18）を加え、37℃一晚保温する。反応槽内では、M13ファージにより感染した大腸菌の培養により、ファージが増殖し、遺伝子が増幅・精製される。

【0029】培養後、最下層の防水膜1を剥がし、吸水性濾紙9を重ねた後、他方の解放面から加圧または吸水性濾紙9の下部から吸引する。これにより、培養液は重層した吸水性濾紙9に移行するが、その際、大腸菌は多孔質膜上層2a上に残り、M13ファージは多孔質膜下層2b上に吸着される。続いて、下層2bを剥がし、M13ファージDNAの固定処理を行い、³²Pで標識した未知または既知の遺伝子をプローブ遺伝子として、ハイブリダイゼーション（相補性試験）を行う。膜上のM13ファージDNAと相補的に結合した標識プローブ量を、オートラジオグラフィー及びBAS1000（Fuji）を用いて定量化する。

【0030】〔実施例2〕図5は、本発明の遺伝子解析装置の一実施例を示すものであり、孔径・材質の異なる2層の多孔質膜（多孔質膜上層2a、多孔質膜下層2b）が積層して形成される底部3と、多孔質膜の上部に設けられた隔壁4とにより形成される複数の反応槽5よりなる。

【0031】この遺伝子解析装置の各反応槽にM13ファージにより感染した大腸菌を植菌したものを、当該装置を設置した時に隔壁の高さを越えない水位に培養液を入れたバットに入れて培養を行う。培養後、装置を取り出し、真空吸引装置により下方から残った培養液を吸引するとともにM13ファージを多孔質膜下層2bに吸着・固定する。培養液は多孔質膜下層2bを通過して吸引され、大腸菌は多孔質膜上層2aに残される。次に、下層2bを剥がし、M13ファージDNAの固定化処理を行い³²Pで標識した未知または既知の遺伝子をプローブ遺伝子としてハイブリダイゼーション（相補性試験）を行う。膜上のM13ファージDNAと相補的に結合した標識プローブ量をオートラジオグラフィー及びBAS1000（Fuji）を用いて定量化する。

【0032】

【発明の効果】本発明により、遺伝子の増幅・精製、多

孔質膜への固定操作、ハイブリダイゼーションを同一反応場中で行うことにより、一度に多数の遺伝子の解析を行うことができる遺伝子解析装置および方法が提供される。また、本発明の遺伝子解析装置は、その反応槽に対応する植菌用治具により、培養細胞を他の装置に接種することにより複製可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の遺伝子解析装置を示す。

【図2】 遺伝子固定膜を複製する工程を示す。

【図3】 多孔質膜上に固定された遺伝子をPCRによ

*て増幅する工程を示す。

【図4】 増幅した遺伝子を多孔質膜下層に固定する工程を示す。

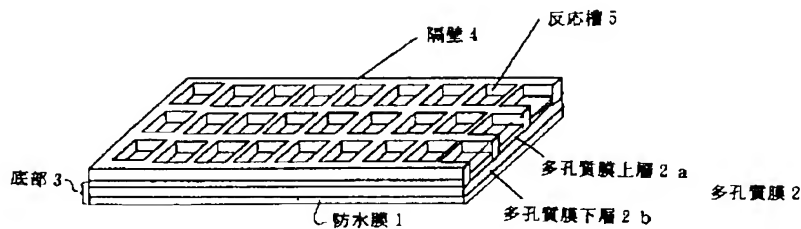
【図5】 増幅した遺伝子を多孔質膜下層に固定する工程を示す。

【符号の説明】

1…防水膜、2…多孔質膜、2a…多孔質膜上層、2b…多孔質膜下層、3…底部、4…隔壁、5…反応槽、6…培養液、7…大腸菌菌体、8…M13ファージ、9…吸水性濾紙、10…パット

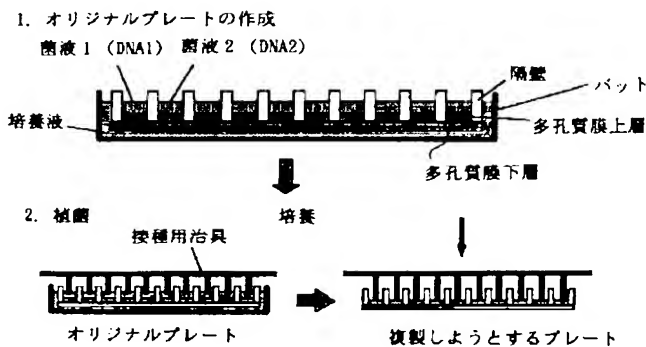
【図1】

本発明の遺伝子解析装置

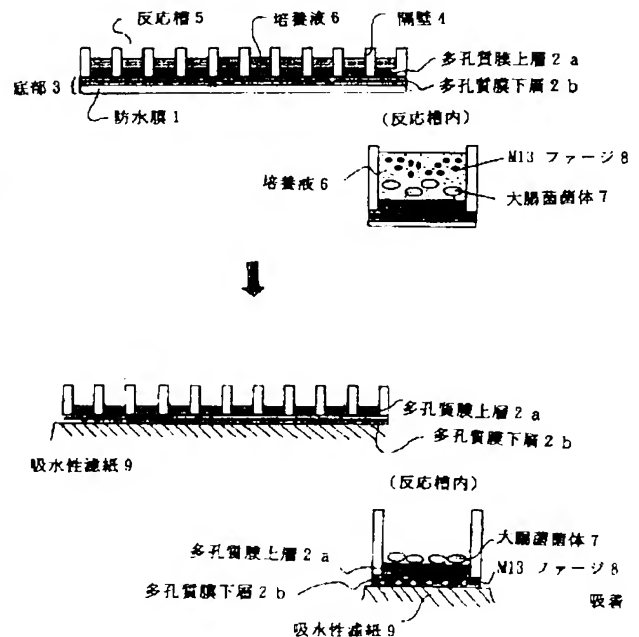


【図2】

遺伝子固定膜の複製

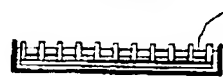


【図4】

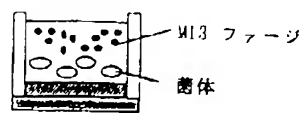


【図3】

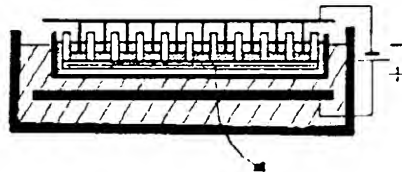
1. 培養（ファージの増殖）



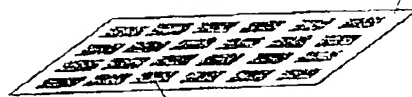
(反応槽)



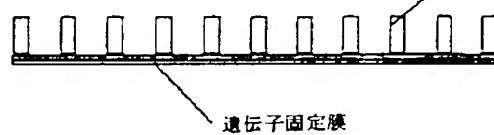
2. 荷電による遺伝子の多孔質膜への吸着・固定



3. 遺伝子固定膜の取り出し

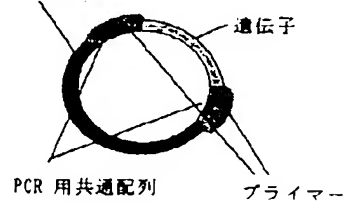


4. 隔壁の再設置



5. プライマー、dNTP、Taq ポリメラーゼの添加

ベクター(M13ファージ)

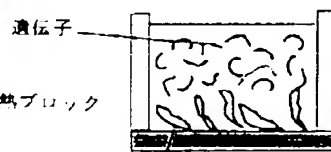


プライマー、dNTP、Taq ポリメラーゼを含む溶液

6. PCR による増幅

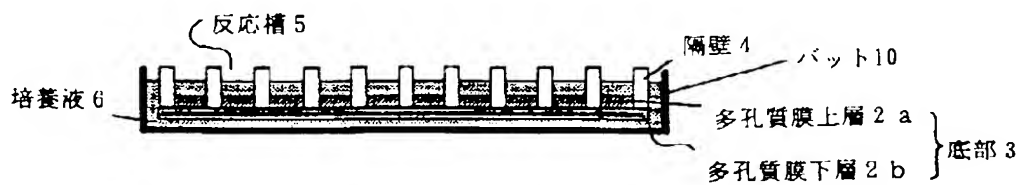


加熱ブロック

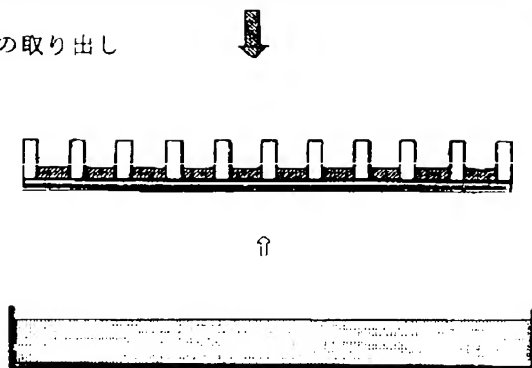


【図5】

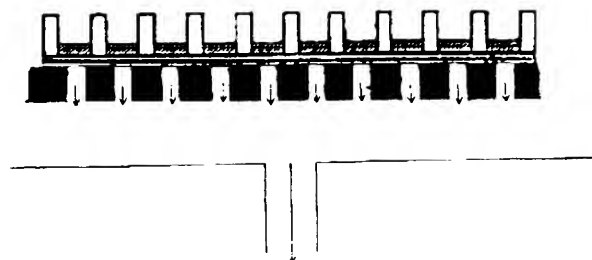
1. 培養



2. 装置の取り出し



3. 真空吸引



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

識別記号

F I

C 1 2 M 1/14

C 1 2 M 1/14

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 1/21

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

A

// (C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(72) 発明者 中川 美和

東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号
大日本印刷株式会社内

(72) 発明者 岡 素裕

東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号
大日本印刷株式会社内